

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Xilanase dari *Trichoderma viride*

Xilanase merupakan enzim yang berfungsi mengubah xilan menjadi xilosa. Xilanase bersifat induktif, sehingga dibutuhkan substrat sebagai induser pada media pertumbuhan untuk menginduksi biosintesis enzim. Substrat yang digunakan harus memiliki kandungan xilan yang tinggi, pada penelitian ini induser yang digunakan adalah kelobot jagung yang mengandung hemiselulosa sebesar 41,16 %.

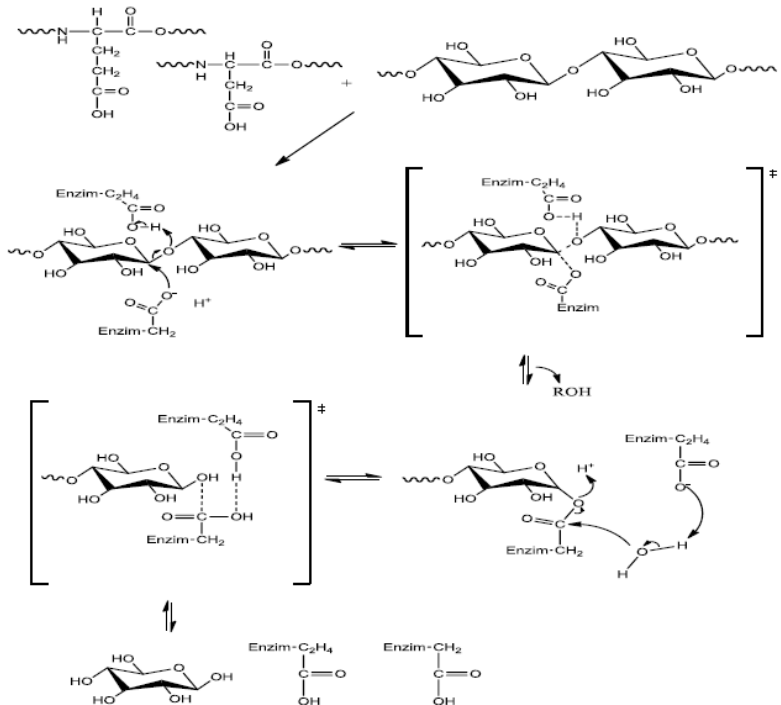
Mikroba yang ditumbuhkan dalam media dengan nutrisi yang terbatas akan mengalami beberapa tahapan fase pertumbuhan. Menurut Monod (1949) perkembangbiakan bakteri dapat dinyatakan dalam grafik logaritma jumlah sel hidup setiap waktu. Tahap awal pertumbuhan adalah fase lag dimana pada fase ini mengindikasikan waktu yang diperlukan bakteri untuk mensintesis enzim yang dibutuhkan dalam metabolisme nutrisi baru. Sel akan mengalami fase percepatan pertumbuhan pada fase eksponensial, dimana nutrisi digunakan untuk membentuk materi sel baru. Pada fase eksponensial merupakan waktu yang dibutuhkan untuk berkembangbiak atau waktu generasi berada pada kondisi maksimal atau konstan. Fase penurunan pertumbuhan terjadi penurunan kecepatan pertumbuhan spesifik yang disebabkan oleh penurunan konsentrasi substrat dan akumulasi hasil metabolisme yang bersifat toksik. Jumlah xilanase yang disintesis sebanding dengan jumlah sel mikroba, semakin banyak sel mikroba semakin banyak juga xilanase yang diproduksi.

Isolasi enzim xilanase diawali dengan peremajaan *Trichoderma viride* pada media padat kentang *dextrose* yang diinkubasi selama enam hari. Selanjutnya dibuat biakan aktif yaitu jamur ditumbuhkan dalam media cair sampai pertengahan fase log (36 jam), karena pada fase ini jamur aktif dalam memproduksi enzim. Jamur kemudian dipindahkan kedalam media cair yang baru dengan rentang waktu

yang sama. Setelah itu enzim xilanase diproduksi dalam media cair yang baru hingga fase akhir logaritma atau fase awal stasioner (60 jam), karena pada fase ini jumlah enzim yang telah diproduksi sebanding dengan jumlah mikroba yang ada sehingga pada saat itu telah dihasilkan enzim dalam jumlah yang maksimal.

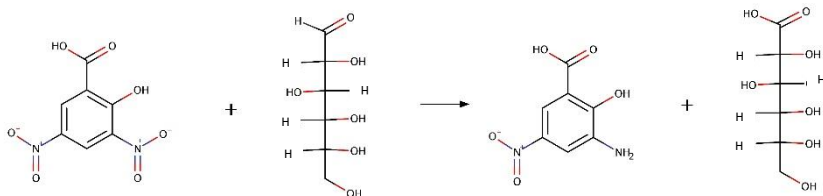
Pembentukan gula pereduksi terjadi melalui reaksi antara sisi aktif enzim dengan substrat xilan. Sisi aktif yang dapat menghidrolisis xilan adalah gugus karboksil ($-\text{COOH}$) yang merupakan rantai samping asam amino jenis asam glutamat dan asam asam aspartat.

Mekanisme reaksi enzimatik pembentukan gula pereduksi (xilosa) diawali dengan pembentukan senyawa imtermediet kompleks enzim substrat. Kompleks ini terbentuk dari gugus fungsi- COOH dari asam aspartat mengalami ionisasi terlebih dahulu sehingga sebagai nukleofil yang menyerang ikatan glikosidik pada atom C_1 yang mengikat atom O pada polimer xilan. Atom O akan tertarik oleh ion H^+ dari gugus fungsi- COOH dan menghasilkan xilosa. Selanjutnya kompleks enzim-substrat terhidrolisis oleh H_2O sehingga ikatannya terputus dan terbentuk produk gula pereduksi (xilosa) dan enzim diperoleh kembali. Mekanisme yang mungkin terjadi terdapat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Mekanisme Reaksi Enzimatis Pembentukan Gula Pereduksi

Aktivitas enzim xilanase bebas diuji dengan menggunakan metode spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS. Penentuan kadar gula pereduksi ini berdasarkan pembentukan kompleks berwarna yang berasal dari asam dinitrosalisilat yang tereduksi oleh gula pereduksi hasil hidrolisis enzim xilanase sehingga menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna kuning kecoklatan yaitu kompleks asam-3-amino 5 nitrosalisilat sedangkan gula pereduksi akan menjadi gula teroksidasi. Reaksi DNS dan glukosa terdapat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Reaksi antara DNS dengan glukosa

Diperoleh aktivitas xilanase bebas sebesar $12,668 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$ dengan kadar protein awal xilanase menggunakan uji biuret sebesar $6,252 \text{ mg mL}^{-1}$. Selanjutnya enzim xilanase bebas diamobilkan pada matriks zeolit Ca-alginat yang telah diaktivasi oleh asam.

4.2 Amobilisasi Xilanase

4.2.1 Preparasi dan Aktivasi Zeolit

Matriks yang digunakan pada penelitian ini adalah zeolit alam. Pada umumnya zeolit alam mengandung banyak pengotor dan luas permukaannya kecil sehingga kemampuan adsorpsinya rendah. Kemampuan adsorpsi zeolit dapat ditingkatkan dengan cara aktivasi. Dalam penelitian ini zeolit yang berbentuk butiran 150 mesh diaktivasi menggunakan HCl 0,4 M. Pengaktifasian menggunakan asam juga dapat meningkatkan keasaman, dan kristalinitas. Selanjutnya zeolit dikalsinasi didalam tanur selama empat jam pada temperatur 500°C . Hal ini bertujuan untuk menghilangkan kristal hidrat dalam butiran sehingga terbentuk oksidanya berupa SiO_2 .

4.2.2 Amobilisasi Enzim

Xilanase dalam bentuk bebas memiliki sifat yang tidak stabil terhadap lingkungan dan tidak dapat digunakan secara berulang. Stabilitas enzim dapat ditingkatkan dengan cara amobilisasi. Penelitian ini menggunakan metode amobilisasi adsorpsi fisik dengan menggunakan zeolit yang teraktivasi, kemudian dijejak dalam larutan Ca-alginat. Ekstrak kasar

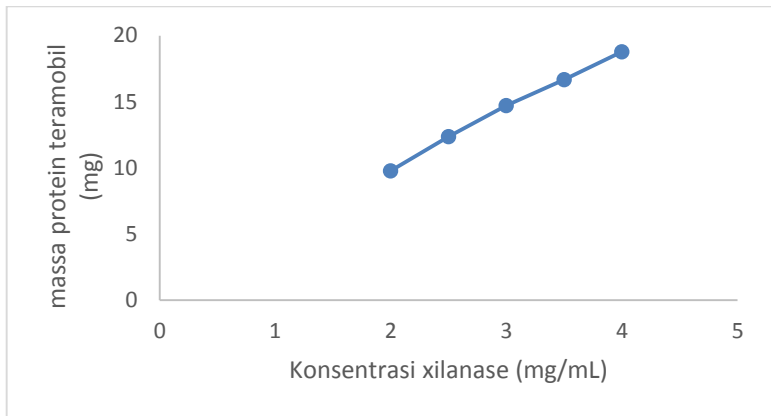
yang dihasilkan dicampur dengan zeolit teraktivasi dan larutan buffer asetat pH 5 (0,2 M) di kocok dengan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 1000 rpm. Larutan buffer asetat pH 5 (0,2 M) berfungsi untuk melarutkan enzim, menjaga stabilitas dan aktivitas enzim. Kekuatan ikatan antara zeolit dengan enzim adalah tergolong lemah sehingga perlu dilakukan pengebakan dengan Ca-alginat. Setelah dishaker, larutan disaring dan filtrat yang didapat ditambahkan pada Na-alginat kemudian dimasukkan dalam syringe dan diteteskan kedalam larutan CaCl_2 sehingga akan dihasilkan manik-manik yang dapat mempermudah proses pemisahan antara enzim yang teramobil dengan filtratnya.

4.3 Penentuan Kondisi Optimum Amobilisasi Xilanase

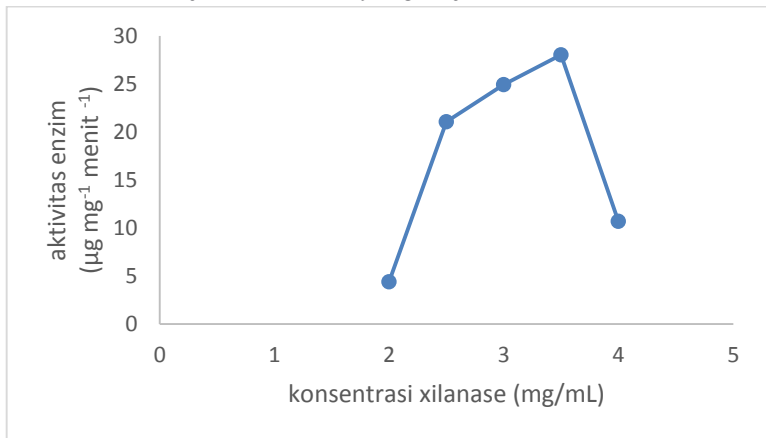
4.3.1 Penentuan konsentrasi xilanase optimum

Pada penelitian ini enzim diamobilkan dengan metode adsorpsi menggunakan matriks zeolit yang teraktivasi. Enzim yang terikat pada permukaan zeolit dijemur dalam manik Ca-alginat. Alginat akan membentuk manik-manik ketika dicampur dengan larutan CaCl_2 karena adanya kation Ca^{2+} yang akan berikatan dengan anion karboksilat (COO^-) dari alginat sehingga terjadi pertukaran antara dua ion Na^+ dengan satu ion Ca^{2+} . Manik-manik yang terbentuk dibiarkan terendam dalam CaCl_2 selama satu jam agar menjadi keras. Manik-manik yang terbentuk kemudian dipisahkan dengan menyaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh enzim amobil dan filtrat yang mengandung CaCl_2 bersama enzim yang tidak terjebak.

Aktivitas xilanase amobil dipengaruhi oleh jumlah xilanase dan mudah tidaknya reaksi enzimatik terjadi. Konsentrasi xilanase optimum ditentukan dengan cara mengukur jumlah xilanase yang teramobilkan dan aktivitasnya.



Gambar 4.3. Pengaruh konsentrasi xilanase terhadap jumlah enzim yang terjebak



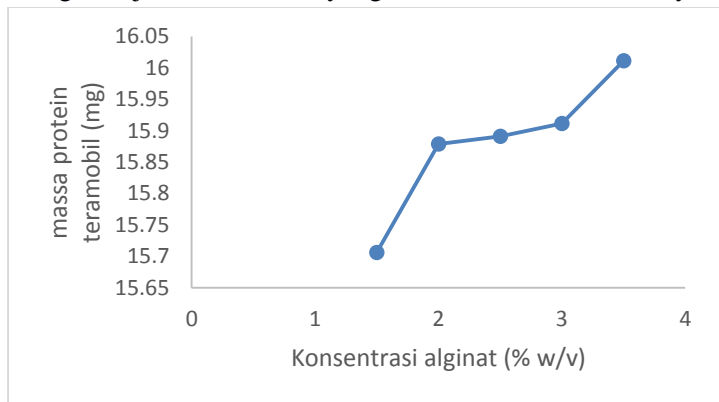
Gambar 4.4. Hubungan antara konsentrasi xilanase terhadap aktivitas enzim amobil

Jumlah enzim yang terjebak didalam manik-manik zeolit Ca-alginat semakin meningkat dari konsentrasi 2 mg/mL hingga 4 mg/mL. Peningkatan ini terjadi karena adanya peningkatan konsentrasi xilanase. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka semakin banyak pula enzim yang teramobil. Namun peningkatan jumlah enzim yang terikat ini tidak diiringi dengan peningkatan aktivitas xilanase amobil.

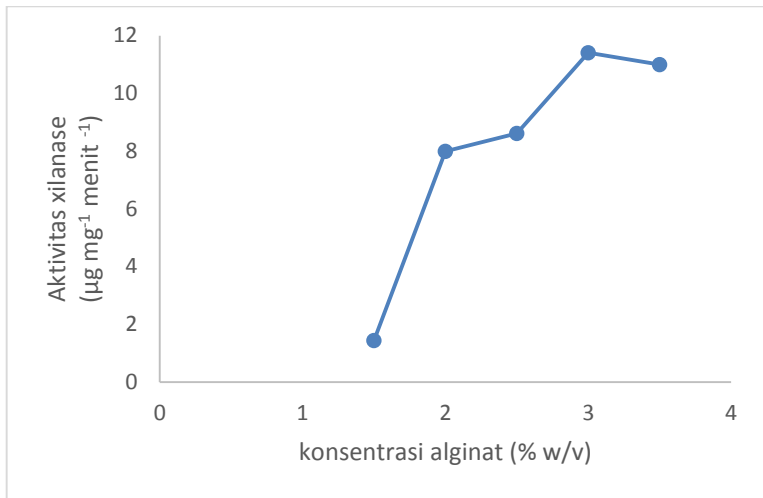
Hal ini dikarenakan semakin banyak jumlah enzim yang terjebak didalam manik zeolit Ca-alginat menyebabkan sisi aktif xilanase menjadi jenuh sehingga tidak ada cukup ruang untuk enzim dapat bergerak dan terjadi tumbukan antar molekul enzim yang teramobil sehingga aktivitas enzim mengalami penurunan karena sedikit substrat yang dapat terhidrolisis oleh xilanase menjadi xilosa. Konsentrasi xilanase optimum adalah konsentrasi dimana xilanase amobil mempunyai aktivitas paling tinggi. Dari Gambar 4.4 diketahui bahwa konsentrasi 3,5 mg/mL merupakan konsentrasi xilanase optimum karena memiliki aktivitas enzim amobil tertinggi yaitu sebesar $28,02 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dengan jumlah xilanase teramobil sebesar 16,68 mg.

4.3.2 Penentuan Konsentrasi Alginat Optimum

Konsentrasi alginat optimum ditentukan dengan cara mengukur jumlah xilanase yang teramobil dan aktivitasnya.



Gambar 4.5. Hubungan antara konsentrasi alginat terhadap massa protein teramobil

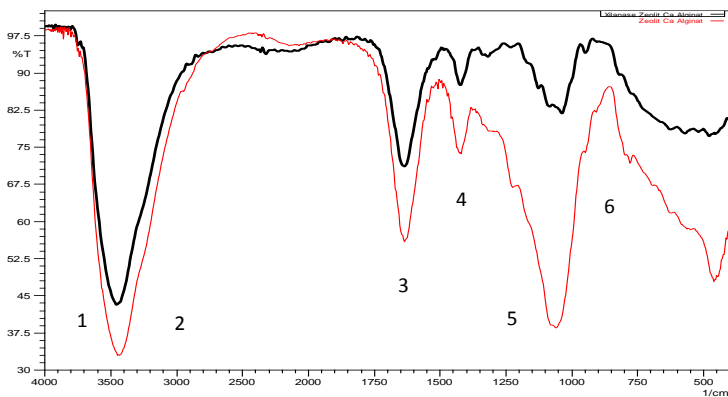


Gambar 4.6. Hubungan antara konsentrasi alginat terhadap aktivitas enzim

Jumlah enzim yang terjebak didalam manik-manik zeolit Ca-alginat semakin meningkat dari konsentrasi 1,5 (% w/v) hingga 3,5 (% w/v). Peningkatan ini terjadi karena adanya peningkatan konsentrasi alginat. Semakin tinggi konsentrasi alginat maka semakin banyak pula enzim yang teramobil. Namun peningkatan jumlah enzim yang terikat ini tidak diiringi dengan peningkatan aktivitas xilanase amobil. Hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi alginat maka menyebabkan tidak adanya cukup ruang untuk enzim dapat bergerak dan terjadi tumbukan antar molekul enzim yang teramobil sehingga aktivitas enzim mengalami penurunan karena sedikit substrat yang dapat terhidrolisis oleh xilanase menjadi xilosa. Dari Gambar 4.5 dan 4.6 diketahui bahwa konsentrasi alginat 3 % w/v merupakan konsentrasi alginat optimum karena memiliki aktivitas enzim amobil tertinggi yaitu sebesar $11,3 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ menit}^{-1}$, dengan jumlah xilanase teramobil sebesar 15,91 mg.

4.4 Identifikasi Xilanase Amobil dengan FTIR

Reaksi antara xilanase dengan matriks zeolit Ca-alginat dapat ditinjau dari identifikasi gugus FTIR antara zeolit Ca-alginat dengan enzim yang telah diamobilkan. Hasil identifikasi kedua senyawa seperti Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Overlay spektra FTIR zeolit Ca-alginat dengan xilanase zeolit Ca-alginat

Tabel 4.1 : Hasil interpretasi spektra FTIR zeolit Ca-alginat dan xilanase zeolit Ca-alginat

No	Gugus Fungsi	Rentang Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	
			Zeolit Ca-alginat	Xilanase zeolit Ca-alginat
1	O-H	2500-2700	3428,03	3447,32
2	N-H	3360-3340	-	3447,32
3	C=O	1630-1680	1636,29	1632,43
4	Alkena aromatik	1400-1650	1418,34	1420,27
5	Si-O	830-1000	1057,68	1082,75
6	Si-OH	830-1000	-	945,82

Dari data yang telah diperoleh, didapatkan perbandingan antara spektra IR zeolit Ca-alginat dengan spektra IR xilanase zeolit Ca-alginat. Diketahui bahwa pada keduanya terdapat gugus fungsi O-H yang berasal dari alginat. Pada bilangan gelombang $3447,32\text{ cm}^{-1}$ di spektra xilanase Ca-alginat terjadi overlap antara gugus O-H dengan gugus N-H. Terdapat beberapa gugus fungsi yang hanya dimiliki oleh salah satu spektra. Pada spektra xilanase zeolit Ca-alginat terdapat serapan N-H pada bilangan gelombang $3447,32\text{ cm}^{-1}$ dan serapan Si-OH pada bilangan gelombang $945,82\text{ cm}^{-1}$. Ikatan N-H tersebut menunjukkan adanya enzim dan ikatan Si-OH menunjukkan adanya ikatan antara sisi aktif enzim dengan matriks zeolit Ca-alginat.